

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—59629

⑪ Int. Cl.<sup>3</sup>  
A 61 K 37/553  
37/00  
37/54

識別記号

庁内整理番号  
7138—4C  
7138—4C  
7138—4C

⑬ 公開 昭和59年(1984)4月5日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑭ 効力持続性組成物

⑯ 特 願 昭57—169160  
⑰ 出 願 昭57(1982)9月27日  
⑱ 発 明 者 平谷一  
大阪府泉南郡阪南町鳥取705番

地3号  
⑲ 出 願 人 日本ケミカルリサーチ株式会社  
神戸市東灘区御影本町3丁目4  
番20号  
⑳ 代 理 人 弁理士 竹内卓

明 細 書

1. 発明の名称

効力持続性組成物

2. 特許請求の範囲

ヒト由来の生理活性を有するポリペプチドもしくは糖たん白質にポリオキシエチレン—ポリオキシプロピレン共重合体を結合させたことを特徴とする効力持続性組成物。

3. 発明の詳細な説明

一般的に、種々のホルモン、酵素等、ポリペプチドを含有する生理活性物質は、生体内に投与された時、生体内で種々のプロテアーゼにより、短時間に分解をうけたり、種々のインヒビターによりすぐ阻害をうけて作用が短時間しか発揮されない。

そのために、医薬品として考慮した場合、目的とする効果が得られ難いものが多かった。

そこで、本発明者らは、生体内で生理活性を持続させる事により、作用をより確実にし、また、投与量を減少させる事が可能なものを種々研究し

た結果、ポリオキシエチレン—ポリオキシプロピレン共重合体(以下、単に共重合体と記す)を生体活性物質に結合させると上記目的が達成されることを見い出した。

本発明は、ヒト由来の生理活性を有するポリペプチドもしくは糖たん白質にポリオキシエチレン—ポリオキシプロピレン共重合体を結合させたことを特徴とする効力持続性組成物である。

別の見地からすれば、本発明は、上記のポリペプチドもしくは糖たん白質に上記の共重合体を結合させることによりその効力を持続させる方法ということもできる。

ポリオキシエチレン—ポリオキシプロピレン共重合体は市場で入手可能であり、平均分子量が1,000ないし14,000即ちポリオキシエチレンとポリオキシプロピレン比が4:16, 196:67あるいは256:54の間の比率の約33種類が主に用いられている。しかしながら、上記共重合体の分子量が1,000を超える共重合体を用いて作成した生理活性物質との結合物は、共

重合体により活性基が包みこまれることにより、活性の発現が低下し、また、生体内に極めて長時間、存在することによつて起る副作用で好ましくない。

それで、本発明においては、好ましくは、分子量約1,000から約10,000の共重合体が用いられる。共重合体は両末端に水酸基を有するが、その一方の水酸基の水素はアルキル基もしくはアシル基で置換されていてもよい。アルキル基の好ましい例はメチル基、エチル基であり、アシル基の例はアセチル基、プロピオニル基である。これらの基の置換は公知の方法によつて行いうる。

本発明においては、ヒト由来の、すなわち、ヒトの尿、胎盤、血液成分より抽出され、または血液成分より誘導され、あるいはヒト細胞の組織培養により製造されたポリペプチドもしくは糖たん白質を用いる。その例としては、絨毛性性腺刺激ホルモン(HCG)、閉経婦人尿性腺刺激ホルモン(HMG)、成長ホルモン(HGH)、上皮細胞増殖因子(EGF)、神経細胞増殖因子(N

GF)、コロニー形成刺激因子(CSF)、ウロキナーゼ(UK)、プラスミノゲン(PLG)、カリクレイン、エリスロポイエチン、チモジン、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$ 、インターロイキン1、インターロイキン2、インターロイキン3、尿トリプシンインヒビター、尿チオールプロテアーゼインヒビター、胎盤アリルスルファターゼ、尿リゾチーム、尿アスパラキナーゼ、などが挙げられる。

本発明においては、前記の共重合体が生理活性ポリペプチドもしくは糖たん白質と結合される。結合は共重合体の末端水酸基と活性物質のアミノ基との間に架橋する結合剤を用いて行われる。結合剤としては、水酸基およびアミノ基と反応しうる官能基をそれぞれ少なくとも1個有するもの、たとえば、2, 4, 6-トリクロロ-S-トリアジン、ジブロモコハク酸無水物、無水マレイン酸などが挙げられる。

たとえば、共重合体をアルカリの存在下に2, 4, 6-トリクロロ-S-トリアジンと反応させ、

得られた反応活性の共重合体を上記の活性物質と反応させると活性物質のN末端第1級アミノ基またはポリペプチド中のリジン残基の $\epsilon$ -アミノ基に、1個所もしくはそれ以上共重合体が結合する。

上記の結合反応は、共重合体の末端水酸基、活性物質のアミノ基および使用する結合剤の反応性に基づいて、公知の方法によつて行うことができる。

本発明の組成物は、生体内において活性物質の効力持続時間を著しく、10~20倍以上も延長させる効果がある。

また、共重合体と生理活性物質との結合物は生体内においてプロテアーゼの作用をうけにくく、しかも種々の血中インヒビターの作用を受けなくなるので、持続性及び活性発現において著しい効果がある。

本発明の組成物は生理活性物質の種類により経口的にまたは非経口的に投与される。非経口的投与は場合により、静脈内、筋肉内、皮下注射の形

で行われる。

投与量は生理活性物質の既知の投与量に比例するが、本発明の組成物においては活性物質の活性単位が若干低下する傾向があるので、1回投与量はその分だけ増加して投与するのが望ましい。ただし、前記のように持続効果が著しいので、活性物質自体としては、たとえば、毎日投与すべきものを数日もしくはそれ以上の間隔を置いて投与することができる。

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

#### 実施例1

2, 4, 6-トリクロロ-S-トリアジン(シブスリツクロライド)5.5g(30mmole)を無水炭酸ナトリウム10gを含む無水ベンゼン400mlに加え、さらにメトキシポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレングリコール(平均分子量5,000、旭電化工業(株)製アルロニツクド-38のモノメチル化物、E. O.: P. O.: E. O. = 46:16:46)50g(10mmole)

mole)を加えて、室温で一晩攪拌した。

次に濾過により不溶物を除いた濾液に、5倍量の石油エーテルを加えて、生成した共重合体の活性化物を沈殿させ、そのものを採取した。さらにベンゼン、石油エーテルを用いて再溶解、再沈殿を2度くりかえして目的とする活性化共重合体51.5gを得た。

次に精製ウロキナーゼ300万単位を4℃の0.1M-リン酸緩衝液pH7.0、30mlに溶解し、上記活性化共重合体600mgを加えて、4℃で3時間攪拌しながら反応させる。

次にpHを5.0以下とし反応を停止させたのち、0.1M-リン酸緩衝液pH5.0で平衡化したセファデックスG-100を用いてゲル濾過を行ない、未反応の活性化共重合体を除く。

得られた修飾ウロキナーゼの平均分子量は150000であり活性は、フィブリンプレート法で40%、蛍光合成基質法で70%残存していた。

又家兎を用いて未修飾ウロキナーゼ及び修飾ウロキナーゼの血中半減期を測定した結果、それぞ

れ5分及び120分となり、半減期において24倍の差が生じた。測定は次のように行なった。

すなわち体重約2.0kgの家兎に1kg当り50,000単位の未修飾ウロキナーゼ及び修飾ウロキナーゼを経時的に採血する耳と反対側の耳静脈より投与した。

採血は、耳介動脈に留置した留置針にシリンジを接続して行なつた。また、ウロキナーゼ投与10-30分前にヘパリンナトリウム1000単位/kgの割合で静脈内投与した。

試料投与前、投与直後、投与後2分、5分、10分、20分、30分、40分、60分、120分及び240分に2ml採血し、その血液を直ちに遠心分離(3000rpm, 5分)し、血漿を採取し、力価測定を行なつて前記結果を得た。

本例におけるウロキナーゼ力価測定法に関するフィブリンプレート法はP. L. Walton, Clin. Chem. Acta 13 (6) 680-684 (1966) により行なつた。

また、蛍光合成基質法T. Morita et al.,

J. Biochem. 82, 1495 (1977) により行なつた。

#### 実施例2

ほぼ純品にまで精製したヒト尿カリクレイン100,000単位を4℃の0.1M-リン酸緩衝液pH7.0、50mlに溶解し、エトオキシエポキシエチレン-ポリオキシプロピレングリコール(平均分子量3400、E. O.: P. O.: E. O. = 19:30:19旭電工業(株)製プロニツクp-65)を例1と同様にして活性化した共重合体0.7gを加えて4℃で3時間攪拌しながら反応させる。

次にpHを5.0以下とし、反応を停止させたのち、0.1M-リン酸緩衝液pH5.0を外液として、4℃で一晩透析を行なつて未反応の活性化共重合体を除いた。

得られた修飾カリクレインの平均分子量は100,000であり、活性は犬を用いる血圧降下法で50%、Pro-Phe-Arg-MCAを用いる蛍光合成基質法で80%残存していた。

また、家兎を用いて、実施例1と同様の方法により採血し、未修飾カリクレイン及び修飾カリクレインの血中半減期を測定した結果、それぞれ7分及び110分となり、半減期において15倍の差が生じた。

本例におけるカリクレイン力価測定法に関する犬を用いる血圧降下法は、J. Biochem. 58, 201, (1965) により行なつた。

また、蛍光合成基質法は、J. Biochem. 82, 1495 (1977) により行なつた。

#### 実施例3

ヒト白血球インターフェロン1億単位(比活性 $2 \times 10^7$  単位/mg-蛋白質)を4℃の0.1M-リン酸緩衝液pH7.0、22mlに溶解し実施例1で用いた活性化重合体220mgを加えて4℃、3時間攪拌しながら反応させる、つぎにpHを5.0以下とし反応を停止させた後、0.1M-リン酸緩衝液pH5.0を外液として、4℃で一晩透析を行なつて未反応の活性化重合体を除いた、得られた修飾インターフェロン $\alpha$ の活性は修飾前の活性に

特開昭59- 59629(4)

比して40%残存していた、活性測定に用いた細胞はFL細胞(ヒト羊膜細胞(Fogh & Lund Strain))であり、チャレンジウイルスとしてはVSV(Vesicular Stomatitis Virus)を用い、マイクロプレート法によるCPE(細胞病変効果)をフェノールレッドのdye-uptake法(N. B. Finter: J. General Virology 5, 419(1969))で判定した、また家兎を用いて実施例1と同様の方法により採血し、未修飾インターフェロン $\alpha$ 及び修飾インターフェロン $\alpha$ の血中半減期を測定した結果それぞれ5分及び80分となり、半減期において16倍の差が生じた。

出 願 人 日本ケミカルリサーチ株式会社

代 理 人 弁理士 竹 内

